

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 5 :</b> C12N 15/82, 15/29, 5/10 A01H 5/00		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 94/01571</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 20. Januar 1994 (20.01.94)
---	--	-----------	--

<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP93/01769	<b>(74) Anwalt:</b> BÜHLING, Gerhard; Tiedtke-Bühling-Kinne & Partner, Bavariaring 4, D-80336 München (DE).
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 7. Juli 1993 (07.07.93)	
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 42 22 407.1 8. Juli 1992 (08.07.92) DE	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstraße 10, D-37073 Göttingen (DE).	<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> MASS, Christoph [DE/DE]; Kolibriweg 14, D-50829 Köln (DE). SCHELL, Jeff [DE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE). STEINBISS, Hans-Henning [DE/DE]; Heckhaus 52, D-53804 Much (DE).	

**(54) Title:** MODULAR PROMOTER CONSTRUCT**(54) Bezeichnung:** MODULARTIGES PROMOTOR-KONSTRUKT**(57) Abstract**

A modular promoter construct contains a promoter active in vegetable cells and a DNA sequence from the exon 1 of the rice actin 1 gene. This modular promoter construct allows a considerable increase of gene expression in vegetable-cells, if required with other regulatory DNA sequences.

**(57) Zusammenfassung**

Es wird ein modulartiges Promotor-Konstrukt beschrieben, das einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und eine DNA-Sequenz aus dem Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis aufweist. Dieses modulartige Promotor-Konstrukt führt ggf. mit weiteren regulatorischen DNA-Sequenzen zu einer beträchtlichen Steigerung der Genexpression in Pflanzenzellen.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakischen Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TC	Togo
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Modulartiges Promotor-Konstrukt

1 Die Erfindung betrifft ein modulartiges Promotor-Konstrukt auf  
der Basis des Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis.

5 Es bestand schon immer das Bedürfnis, agronomisch wichtige Ge-  
treidepflanzen mit verbesserten Eigenschaften auszustatten. Früher hat man auf klassischem Wege Erbanlagen bzw. Gene in  
die betreffenden Pflanzen eingekreuzt. Seit Etablierung der  
10 Gentechnologie ist es möglich, definierte Gene in das Genom  
von Getreidepflanzen, wie beispielsweise Reis, Mais, Weizen  
und Gerste, einzuschleusen. Neben der Auswahl des richtigen  
selektiven Marker-Gens und der agronomisch wichtigen Gene ist  
die Wahl des richtigen Promotors zur effektiven Expression des  
gewünschten Gens maßgeblich. Der am meisten verwendete Promo-  
15 tor zur Erhöhung der Expression von chimären Genen in monoko-  
tyledonen Getreidepflanzen stammt aus dem Cauliflower Mosaic  
Virus (CaMV) 35S RNA-Gen (Odell et al., Nature 313, Seiten 810  
bis 820, 1985). Dieser Promotor ist jedoch im Vergleich zu di-  
kotyledonen Pflanzen relativ wenig aktiv in monokotyledonen  
20 Pflanzen (Töpfer et al., Meth. Enzymol., "Rec. DNA", im  
Druck). So sind alternative Genexpressionsvektoren unter Ver-  
wendung starker Promotoren, wie die Promotoren des Aktin 1-  
Gens aus Reis (Mc Elroy et al., Plant Cell 2, Seiten 163 bis  
171, 1990) und des Ubiquitin-Gens aus Mais (Christensen and  
25 Fox, International Society for Plant Molecular Biology Mee-  
ting, Program Abstracts, No. 287, 1991) beschrieben worden.

30 In Analogie zu tierischen Systemen (Dynan, Cell 58, Seiten 1  
bis 4, 1989) ist es ebenfalls für Pflanzengene wahrscheinlich,  
daß die durch die RNA-Polymerase II vermittelte Transkription  
von modulartigen, d.h. aus verschiedenen regulierenden DNA-Se-  
quenzen bestehenden Elementen abhängt. Es ist bereits für eine  
Anzahl von verschiedenen modulartigen Elementen gezeigt wor-  
den, daß sie eine wichtige Rolle bei z.B. der gewebespezifi-  
35 schen Transkription spielen (Katagiri und Chua, Trends Gent.  
8, Seiten 22 bis 70, 1992).

1

2

So ist aus der DE-OS 41 24 537 eine modularartige Promotor-Konstruktion bekannt, mit der die Genexpression fremder Gene in Pflanzenzellen gesteigert werden kann. Dabei wird eine DNA-Sequenz aus dem Exon 1 des Saccharosesynthase-Gens aus *Zea mays L.* zwischen Promotor und das zu exprimierende Gen eingesetzt. Eine weitere multiplikative Steigerung der Genexpression ist möglich, wenn an die genannte DNA-Sequenz eine weitere DNA-Sequenz gekoppelt wird, die im wesentlichen dem Intron 1 aus dem Saccharosesynthase-Gen aus *Zea mays L.* entspricht.

Die Isolierung von in der 5'-Region liegenden Promotorsequenzen des Aktin 1-Gens aus Reis ist von Mc Elroy et al., a.a.O., beschrieben worden. Es hat sich herausgestellt, daß eine positive Korrelation zwischen den Promotorsequenzen und den nachfolgenden Intronsequenzen besteht. So hat sich ein Promotor-Konstrukt aus diesen Sequenzen bei Transformationsuntersuchungen von Reis-Protoplasten als wirksamer Regulator der konstitutiven Expression eines fremden Gens erwiesen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Promotor zur Verfügung zu stellen, mit dem man fremde Gene in Pflanzen mit hoher Effizienz exprimieren kann.

Diese Aufgabe wird durch ein modularartiges Promotor-Konstrukt gemäß Patentanspruch 1 gelöst.

Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Promotor-Konstrukts.

Die Erfindung betrifft somit ein modularartiges Promotor-Konstrukt, das einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und eine DNA-Sequenz aus dem Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis aufweist und die Allele sowie Derivate dieses modularartigen Promotor-Konstrukts.

1      Die Erfindung betrifft weiterhin Vektoren, die die erfindungsgemäßen Promotor-Konstrukte enthalten.

5      Die Erfindung betrifft ebenfalls Pflanzenzellen, die mit den genannten Vektoren transformiert sind.

10     Die Erfindung betrifft außerdem Pflanzen und deren Vermehrungsgut, die aus den genannten Pflanzenzellen regeneriert sind.

15     Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Promotor-Konstrukte zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Genexpression.

20     Die Figuren dienen zur Erläuterung der Erfindung. Es zeigen:

25     Fig. 1      chimäre Genkonstrukte für transiente Genexpressionsexperimente,

30     Fig. 2      eine schematische Darstellung des Aktin 1 (Akt 1)-Gens aus Reis mit der verwendeten Exon 1-DNA-Sequenz,

35     Fig. 3      ein Dünnschichtchromatogramm der transienten Expression von chimären Konstrukten in *Hordeum vulgare* Protoplasten,

40     Fig. 4      ein Dünnschichtchromatogramm der transienten Expression von chimären Konstrukten in *Triticum monococcum* Protoplasten und

45     Fig. 5      ein Dünnschichtchromatogramm einer weiteren transienten Genexpression in *Hordeum vulgare* Protoplasten.

1 Bei dem erfindungsgemäßen Promotor-Konstrukt handelt es sich um einen die RNA-Polymerase II stimulierenden Promotor. Das erfindungsgemäße modulartige Promotor-Konstrukt weist einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und eine daran gekoppelte 5 regulatorische DNA-Sequenz auf. Diese DNA-Sequenz stammt aus dem Exon 1 des Aktin 1-Gens (Akt1-Exon1-Sequenz) aus Reis. Die im Promotor-Konstrukt enthaltene DNA-Sequenz entspricht vorzugsweise der Sequenz von der Position +4 bis +57 im Exon 1 des Aktin 1-Gens, wie aus Fig. 2 zu entnehmen ist. Das untranslatierte Exon 1 ist vom Startpunkt der Translation in Exon 2 durch ein Intron (Intron 1) getrennt. Das Exon 1 liegt somit in der 5'-transkribierten, jedoch untranslatierten Region des Aktin 1-Gens. Die gesamte Sequenz des Exon 1 des genannten Gens ist bei Mc Elroy et al., (a.a.o.) beschrieben.

10

15 Die Akt1-Exon1-Sequenz ist GC-reich (77 %) und wirkt als die RNA-Polymerase II stimulierendes Element, wenn es sich in downstream-Richtung der Transkriptionsstartstelle befindet.

20 Es wurde gefunden, daß, wenn das erfindungsgemäße modulartige Promotor-Konstrukt an ein in einer Pflanzenzelle zu exprimierendes Gen gekoppelt ist, die Expression dieses Gens erheblich gesteigert wird, wobei eine mindestens 10-fache Steigerung der Genexpression festgestellt werden konnte.

25

30 Die Genexpression kann weiterhin um das 100-fache erhöht werden, wenn die Akt1-Exon1-Sequenz mit dem Intron 1 des Saccharosesynthase-Gens aus Zea mays kombiniert wird, was überraschenderweise zu einer Erhöhung der Genexpression auf bis mindestens das 1000-fache führt.

35 Es hat sich herausgestellt, daß die 18 bp OTF-Bindungsstelle des Promotors der Octopinsynthase (OCS-Enhancer) beispielsweise mit dem CaMV 35S-Promotor kompatibel ist. Wenn man

1 die OTF-Bindungsstelle mit der Akt1-Exon1-Sequenz und dem Intron 1 aus dem Saccharosesynthase-Gen aus *Zea mays L.* kombiniert, erhält man eine sprunghafte Steigerung der Genaktivität um mindestens das 4000-fache.

5

Aus dem Vorstehenden ergibt sich, daß sich die Genexpression in Abhängigkeit von der mit dem zu exprimierenden Gen gekoppelten regulativen DNA-Sequenz multipliziert. Somit kann mit dem erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukt eine 10 Multiplikation der Genaktivität erreicht werden.

Die erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukte sowie 15 die Vektoren enthalten als einen Pflanzenzellen wirksamen Promotor, wie beispielsweise den CaMV 35S-Promotor, den Nopalinsynthase-Promotor oder den Saccharosesynthase-Promotor.

Das erfindungsgemäße modulartige Promotor-Konstrukt eignet 20 sich für die Expression aller Arten von Fremdgenen, wie beispielsweise Resistenzgenen, wie sie z.B. aus der EP-A 0 257 542 und der EP-A 0 275 957 bekannt sind, wie auch zur Herstellung von proteinogenen Wirkstoffen in Pflanzen beispielsweise nach DD-A 12 65 164. Von besonderer Bedeutung sind Gene für Speicherproteine, wie z.B. Zeine oder Hordeine.

25 In downstream-Richtung an das zu exprimierende Gen enthalten die erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukte sowie die Vektoren, die die erfindungsgemäßen Promotor-Konstrukte enthalten, Polyadenylierungsregionen aus dem CaMV 35S- oder Octopinsynthase (OCS)-Gen (Hein et al., Mol. Gen. Genet., 199, 30 Seiten 161 bis 168 (1985).

35 Das erfindungsgemäße modulartige Promotor-Konstrukt eignet sich zur Expression fremder Gene in monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen. Als monokotyledone Pflanzen kommen beispielsweise Getreidepflanzen, wie Weizen, Gerste, Mais und

1 Reis in Frage. Als dikotyledone Pflanze läßt sich z.B. Tabak (*Nicotiana tabaccum*) in zufriedenstellender Weise transformieren.

5 Es ist selbstverständlich, daß im Rahmen der Erfindung auch allelische Varianten und Derivate des oben genannten modulartigen Promotor-Konstrukts erfaßt sind, unter der Voraussetzung, daß diese modifizierten modulartigen Promotor-Konstrukte die gleiche Funktion wie die oben genannten Promotor-Konstrukte ausüben, d.h. stimulierend auf die Genexpression wirken. Zu den allelischen Variationen und Derivaten zählen beispielsweise Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversionen oder Additionen der einzelnen Sequenzen des erfindungsgemäßen Promotor-Konstrukts.

10 15 Die Transformation von Pflanzen mit einem fremden Gen unter Verwendung des erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukts kann mit Hilfe üblicher Transformationsverfahren durchgeführt werden. Besonders bevorzugt ist die Protoplasten-20 transformation mit anschließender Regeneration der aus den transformierten Protoplasten entstandenen Pflanzenzellen zu einer Pflanze.

25 In den nachfolgenden Beispielen werden besonders bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukts beschrieben.

30 Beispiel 1  
Plasmidkonstruktionen

35 Die nachfolgend beschriebenen Plasmidkonstruktionen lassen sich der Fig. 1 entnehmen. Die dort gezeigten chimären Genkonstruktionen wurden für transiente Genexpressionsexperimente verwendet. Die Startstelle der Transkription und das Polyadenylierungssignal des CaMV 35S-Gens sind in allen Kon-

1 struktionen gleich. Die für das Klonieren relevanten Restriktionsstellen sind zusätzlich eingeführt worden. Der Polylinker (P) zwischen dem Transkriptions- und Translationsstart umfaßt vom 5'- zum 3'-Ende die Restriktionsstellen X, D, EI und K.  
5 Die Restriktionsstellen werden folgendermaßen abgekürzt: *Bcl*I (B), *Eco*RI (EI), *Eco*RV, (EV), *Hind*III (H), *Hinc*II (A), *Kpn*I (K), *Sma*I (S), *Sst*II (C), *Xho*I (X). Der CaMV 35S-Promotor ist mit "enhancer core" und die OTF-Bindungsstelle mit "OCS" gekennzeichnet.

10

Sämtliche Plasmidkonstruktionen wurden nach üblichen Verfahren, wie sie beispielsweise bei Sambrook et al, Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, beschrieben sind, hergestellt.

15

Alle Plasmidkonstruktionen leiten sich vom chimären Plasmid pRT 101 CAT ab (Pröls et al., Plant Cell. Rep. 7, Seiten 221 bis 224, 1988), welches das CAT-Markergen (CAT = Chloramphenicol-Transacetylase) enthält. Zur Herstellung des chimären Plasmids pCM 1106 wurde die nicht-translatierte Sequenz des Exon 1 des Aktin 1-Gens (Akt1-Exon1-Sequenz) von der Position +4 bis +57 in die einzige *Sma*I-Restriktionsstelle (S) im 5'-nicht translatierten Leader des pRT 101 CAT-Plasmids eingefügt. Hierzu sei auf die Fig. 2 verwiesen, woraus die verwendete Sequenz aus dem Exon 1 und ihre Position innerhalb des Exon 1 zu entnehmen ist. Bei Einführung der genannten DNA-Sequenz stellt man die *Sma*I-Restriktionsstelle durch 3'-terminale Cystosinreste des Aktin 1-Elements wieder her (siehe auch Fig. 2, Position +55 bis +57).

20

25

30

35

Man isoliert die Intron 1-Sequenzen aus dem Saccharosesynthase-Gen (*Sh1*) aus Mais (Position +43 bis +1084) aus dem aus der DE-OS 41 24 537 bekannten chimären Plasmid pSP 1076 + 1084 als *Hinc*II-Restriktionsfragment und fügt es in die *Sma*I-Re-

1 striktionsstelle von pCM 1106. Auf diese Weise erhält man die  
chimäre Plasmidkonstruktion pCM 1111.

5 Man synthetisiert mit einem DNA-Synthesizer (Applied Biosystem  
380 B) die in Fig. 2 gezeigte Sequenz aus dem Exon 1 des Aktin  
1-Gens aus Reis und die 18 bp OTF-Bindungsstelle mit der Se-  
quenz AACGTAAGCGCTTACGTT (Ellis et al., EMBO J. 6, Seiten 3203  
bis 3208, 1987). Man subkloniert dann die OTF-Bindungsstelle  
10 in die einzige *Sma*I-Restriktionsstelle des handelsüblichen  
Plasmids pUC 19 und erhält pOTF 18. Für die Herstellung der  
chimären Plasmide pCM 1112 und pCM 2107 isoliert man aus pCM  
1111 und pCM 2106 ein *Hinc*II (A)/*Hind*III (H)-Restriktionsfrag-  
ment (*Hind*III ist ein partieller Verdau von pCM 1111) und fügt  
es in die einzige *Hinc*II-Restriktionsstelle von pOTF 18 ein.

15

Für die Herstellung des Plasmids pCM 1107 entfernt man den Po-  
lylinker des chimären Plasmids pCM 1106 durch eine Restrikti-  
onsverdauung mit *Xho*I (X) / *Kpn*I (K). Man entfernt die über-  
stehenden Enden mit einer vorsichtigen S1-Behandlung. Die Au-  
20 tolegierung führt zu dem Plasmidkonstrukt pCM 1107, welches im  
Vergleich zu pCM 1106 eine Deletion von 11 Basenpaaren zwi-  
schen der Stelle des Transkriptionsstartes und der Akt1-Exon1-  
Sequenz aufweist.

25

Das Promotordeletionsplasmid pCM 2106 wird hergestellt, indem  
CaMV 35S-Promotorsequenzen von pCM 1106 in upstream-Richtung  
der *Eco*RV (EV)-Restriktionsstelle bei Position -90 entfernt  
werden.

30

### Beispiel 2

#### 2.1 Analyse der transienten Expression

35

Man führt nach der für Mais beschriebenen Methode (Maas und  
Werr, Plant Cell. Rep. 8, Seiten 148 bis 151, 1989) eine Pro-  
toplastenisolation aus einer Zellsuspension der Gerstenlinie

1     *Hordeum vulgare* L. cv. *Golden Promise* mit der Maßgabe durch,  
daß man eine Osmolarität von 720 mosm verwendet. Die Aufzucht  
einer Zellsuspension der Linie *Triticum monococcum* (Einkorn)  
und Protoplastenisolation wurde wie im wesentlichen durch Lörz  
5     et al., Mol. Gen. Genet. 199, Seiten 178 bis 182, 1985 und  
Matzeit et al., Plant Cell 3, Seiten 247 bis 258, 1991)  
beschrieben, durchgeführt.

10    Die Transformation der *Hordeum vulgare* und *Triticum monococcum*  
Protoplasten wurde wie bei Maas und Werr a.a.O. und Maas et  
al., a.a.O., beschrieben durchgeführt. Man transformiert etwa  
1  $\times$  10<sup>6</sup> Protoplasten mit 25  $\mu$ g Plasmid-DNA und 100  $\mu$ g soni-  
fizierter Kalbsthymus-DNA und fügt einen durch PEG ver-  
mittelten Gentransfer durch (PEG-Lösung: 25 % PEG (1500), 0,1  
15    M MgCl<sub>2</sub>, pH 6,0). Man untersucht die Genexpression anhand des  
Gehalts an gebildetem Protein 15 bis 19 Stunden nach der  
Transformation.

20    2.2 Bestimmung der CAT-Aktivität

25    Man zentrifugiert die transformierten Zellen für die CAT-Akti-  
vitätsbestimmung, resuspendiert in 60  $\mu$ l 500 mM Tris/HCl bei  
einem pH-Wert von 7,5 (2 mM PMSF) und lysiert in zwei Zyklen  
unter Frieren und Tauen. Man klärt den Extrakt durch Zentrifu-  
gieren auf. Man verwendet 20  $\mu$ l des Überstandes zur Proteinbe-  
stimmung gemäß Bradford, Anal. Biochem. 72, Seiten 248 bis  
254, 1976. Die CAT-Aktivitätsbestimmung wird, wie im wesentli-  
chen durch Gorman et al., Mol. Cell. Biol. 2, Seiten 1044 bis  
30    1051, 1982 beschrieben, über Dünnschichtchromatographie durch-  
geführt. Die Extrakte wurden während 10 Minuten bei 65°C  
vorinkubiert, wobei 250  $\mu$ g BSA in die Reaktionsmischung hin-  
zugefügt wurde.

35    Für jedes Plasmidkonstrukt wurde parallel zwei Transfor-  
mationen durchgeführt. Man kultiviert die behandelten Protopla-

1 sten und vereinigt sie, um die Unterschiede durch die ver-  
schiedenen Transformationsleistungen herabzusetzen. Man analy-  
siert eine Hälfte ( $1 \times 10^6$  Protoplästen) dieser Mischung auf  
CAT-Aktivität. Aufgrund der hohen CAT-Aktivitäten in unver-  
5 dünnten Extrakten stellt man serienmäßig 1:10-Verdünnungen  
(1:10, 1:100, 1:1000) her, um somit lineare CAT-Aktivitäten  
für die densitometrische Untersuchung der Autoradiographien zu  
erhalten.

10 **2.3 Untersuchungsergebnisse**

**2.3.1 *Hordeum vulgare***

15 Die Untersuchungen der Genexpression in *Hordeum vulgare* Proto-  
plasten mit den in Beispiel 1 beschriebenen chimären Plasmiden  
hat zu folgenden Ergebnissen geführt.

20 Die Ergebnisse der relativen CAT-Aktivitäten lassen sich dem  
Dünnschichtchromatogramm der Fig. 3 entnehmen. Aufgrund der  
hohen CAT-Aktivitäten im Rohextrakt wurde die Aktivität einer  
1:100-Verdünnung mit  $1 \times 10^4$  Protoplasten gemessen. Die Abkür-  
zungen haben folgende Bedeutungen: CAT = Chloramphenicol-  
Transacetylase; Cm = C<sup>14</sup>-markiertes Chloramphenicol allein;  
Cont = Proteinextrakte von nicht transformierten Kontrollproto-  
25 plasten und 1, 3, 1,3 Cm = an den angegebenen Positionen  
acetyliertes Chloramphenicol.

30 Es ergibt sich beim chimären Plasmid pCM 1106 im Vergleich zum  
Referenzplasmid pRT 101 CAT eine bis zu mindestens 10-fache  
Erhöhung der Markergenexpression.

35 Am chimären Plasmid pCM 1111 ist zu erkennen, daß, wenn die  
Akt1-Exon1-Sequenz mit den Intron 1-Sequenzen aus dem  
Saccharosesynthase-Gen kombiniert wird, die Markergenexpres-  
sion auf das mindestens 1000-fache erhöht wird.

1 Die 18 bp OTF-Bindungsstelle des Octopinsynthase-Promotors mit  
 dem gesamten CaMV 35S-Promotor kann mit der Akt1-Exon1-Sequenz  
 sowie dem Intron 1 aus dem Saccharosesynthase-Gen interagieren.  
 5 Die Einführung der OTF-Bindungsstelle in das chimäre  
 Plasmid pCM 1111, welches die Akt1-Exon1-Sequenz und Sequenzen  
 aus dem Intron 1 des Saccharosesynthase-Gen enthält, führt zu  
 einer weiteren mindestens 3- bis 4-fachen Erhöhung des Stimu-  
 lationsverhältnisses (siehe pCM 1112). Dieses Ergebnis erhält  
 man auch mit einer 1:1000-fachen Verdünnung (nicht gezeigt).  
 10 Somit ist eindeutig belegt, daß die stimulierende Wirkung der  
 Kombination aus verschiedenen individuellen DNA-Sequenzen mul-  
 tiplikativ und nicht additiv ist.

15 In diesem Zusammenhang wird auf die nachfolgende Tabelle 1  
 verwiesen, worin die CAT-Aktivitäten aus Fig. 3 der chimären  
 Plasmide pCM 1106, pCM 1111 und pCM 1112 in Relation zum Refe-  
 renzplasmid pRT 101 CAT (Aktivität = 1) in *Hordeum vulgare*  
 Protoplasten aufgeführt sind.

20

Tabelle 1

25

pRT 101 CAT	pCM 1106	pCM 1111	pCM 1112
1	7,5-12,5	872-1242	3897-6985

2.3.2 *Triticum monococcum*

30 Die Untersuchungen der Genexpression in *Triticum monococcum*  
 Protoplasten mit den in Beispiel 1 beschriebenen chimären  
 Plasmiden hat zu folgenden Ergebnissen geführt.

35 Wie sich aus Fig. 4 entnehmen läßt, erreicht man mit  
 transformierten *Triticum monococcum* Protoplasten gleiche Sti-  
 mulationsverhältnisse der Genexpression wie mit *Hordeum vul-*

1 gare Protoplasten. So führt die Einfügung der Akt1-Exon1-Se-  
 quenz zu einer mindestens 10-fachen Erhöhung der Mar-  
 kergenexpression (pCM 1106). Die Kombination der Akt1-Exon1-  
 Sequenz mit den Intron 1-Sequenzen des Saccharosesynthase-Gens  
 5 ergeben eine mindestens 1000-fache Erhöhung der Genexpression.

10 In diesem Zusammenhang wird auf die nachfolgende Tabelle 2  
 verwiesen, worin die CAT-Aktivitäten der chimären Plasmide pCM  
 1106 und pCM 1111 der Fig. 4 in Relation zum chimären Refe-  
 renzplasmid pRT 101 CAT (Aktivität = 1) verglichen werden.

Tabelle 2

pRT 101 CAT	pCM 1106	pCM 1111
1	7,5-11,9	913-1203

15 Das Dünnschichtchromatogramm in Fig. 5 zeigt, daß die Akt1-  
 Exon1-Sequenz nicht ohne regulatorische Sequenzen in upstream-  
 20 Richtung zu einer Erhöhung der Genexpression führt. Die Akt1-  
 Exon1-Sequenz erhöht die Markergenexpression bis auf das min-  
 destens 10-fache, wenn sie in downstream-Richtung des gesamten  
 25 CaMV 35S-Promotors eingefügt ist (pCM 1106). Dagegen hebt die  
 Deletion des CaMV 35S-Promotor im chimären Plasmid pCM 1106  
 (pCM 2106, Fig. 1) das Stimulationsvermögen der Akt1-Exon1-Se-  
 quenz völlig auf.

30 Da die Akt1-Exon1-Sequenz die Anwesenheit von regulatorischen  
 Elementen in upstream-Richtung zur effektiven Markergenexpres-  
 sion benötigt, kann die Aktivität des chimären Plasmids pCM  
 2106 durch Einfügung von regulatorischen Elementen in up-  
 stream-Richtung wieder hergestellt werden. So wurde die 18 bp  
 35 OTF-Bindungsstelle als regulatorische Sequenz in upstream-  
 Richtung des CaMV 35S-Promotors des chimären Plasmids pCM 2106  
 unter Bildung des chimären Plasmids pCM 2107 eingefügt (siehe

1 auch Fig. 1). Die transiente Genexpression des chimären Plas-  
 mids pCM 2107 zeigt, daß die Akt1-Exon1-Sequenz im nicht sti-  
 mulierenden chimären Plasmid pCM 2106 wieder ihre mindestens  
 5 10-fache stimulierende Wirkung entfaltet, wenn das Plasmid die  
 OTF-Bindungsstelle enthält.

Am Beispiel der chimären Plasmide pCM 1106 und pCM 1107 ist zu  
 erkennen, daß die Entfernung zur Transkriptionsstartstelle des  
 10 heterologen Promotors ebenfalls sehr wichtig ist. Die Deletion  
 von 11 Basenpaaren im Polylinker von pCM 1106, die sich zwi-  
 schen der Transkriptionsstartstelle und den Akt1-Exon1-Sequen-  
 zen befinden, heben die stimulatorische Wirkung des Promotor-  
 konstrukts auf (pCM 1107). Demnach sollte die Entfernung zwi-  
 15 schen Transkriptionsstartstelle und Akt1-Exon1-Sequenz bevor-  
 zugt mindestens 11 bp betragen.

Die relativen Werte der Erhöhung der Genexpression anhand der  
 in Fig. 5 gezeigten chimären Plasmiden sind aus der nachfol-  
 genden Tabelle 3 zu entnehmen. In dieser Tabelle werden die  
 20 CAT-Aktivitäten der chimären Plasmide pCM 1106, pCM 1107, pCM  
 2106 und pCM 2107 in Relation zum chimären Referenzplasmid pRT  
 101 CAT (Aktivität = 1) in *Hordeum vulgare* Protoplasten  
 verglichen.

25

Tabelle 3

pRT 101 CAT	pCM 1106	pCM 1107	pCM 2106	pCM 2107
1	8,1-12,4	0,8-1,2	0,8-1,15	8,9-14,5

30

Bei dem erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukt han-  
 delt es sich somit um einen ggf. aus einzelnen regulativen  
 DNA-Sequenzen aufgebauten effektiven Promotor, mit dem es mög-  
 lich ist, die Genexpression fremder Gene in Pflanzenzellen auf  
 35 das bis zu mindestens 4000-fache zu erhöhen. Eine zentrale

14

1 Rolle spielt eine DNA-Sequenz aus dem 5'-nicht translatierten Bereich des Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis. Diese Sequenz ist ein die RNA Polymerase II stimulierendes cis-Element, das sich in downstream-Richtung der Transkriptionsstartstelle 5 befinden muß und nur in Gegenwart von regulatorischen DNA-Sequenzen in upstream-Richtung seine stimulierende Wirkung auf die Genexpression entfaltet.

10

15

20

25

30

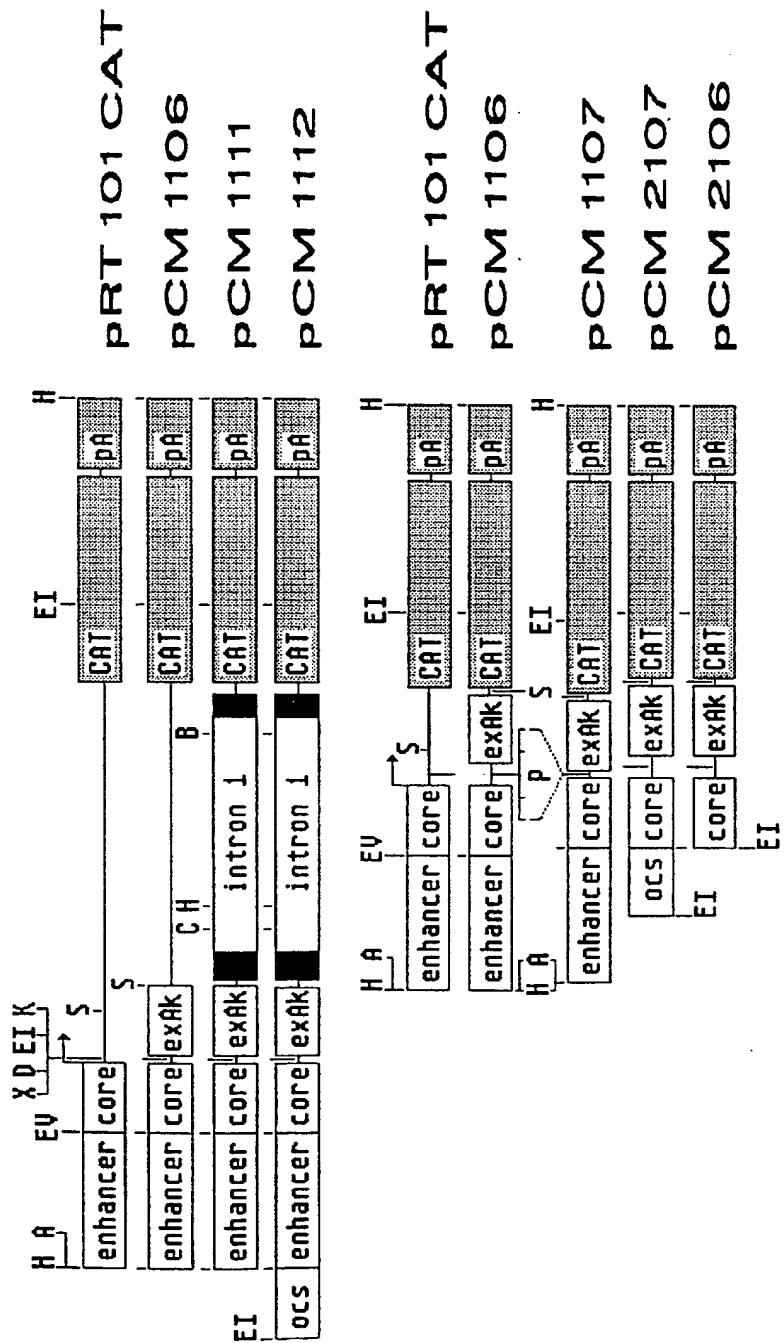
35

Patentansprüche

1. Modularartiges Promotor-Konstrukt, das einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und eine DNA-Sequenz aus dem Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis aufweist und die Allele sowie Derivate dieses modularartigen Promotor-Konstrukts.
2. Promotor-Konstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz der Position +4 bis +57 im Exon 1 des Aktin 1-Gens entspricht.
3. Promotor-Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin eine DNA-Sequenz aus dem Intron 1 des Saccharosesynthase-Gens von Mais enthält.
4. Promotor-Konstrukt nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich eine 18 bp OTF-Bindungsstelle enthält.
5. Vektor, enthaltend ein Promotor-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das an ein in einer Pflanzenzelle zu exprimierendes Gen gekoppelt ist.
6. Pflanzenzelle, die mit einem Vektor nach Anspruch 5 transformiert ist.
7. Pflanze und deren Vermehrungsgut, regeneriert aus einer Pflanzenzelle nach Anspruch 6.
8. Verwendung des Promotor-Konstrukt nach den Ansprüchen 1 bis 4, zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Genexpression.

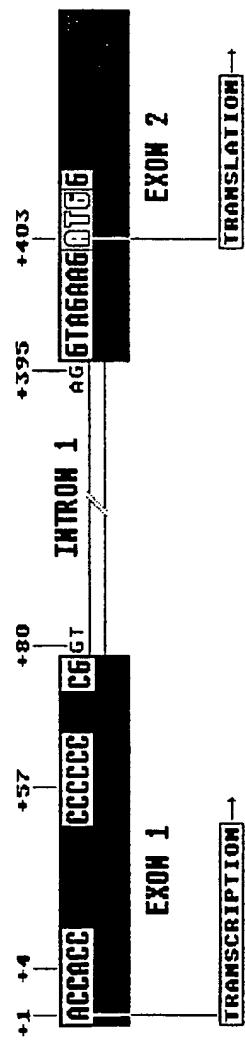
1/5

FIG. 1



2/5

FIG. 2

Aktin 1 (Act1) Gen (Reiss)Verwendete Exon1-DNA-Sequenz

<sup>+4</sup> ACCACCACCAACCACTCCTCCCCC  
<sup>+57</sup> TCGCTGGGGAGGAGGAGGCTCCTCCCC

3/5

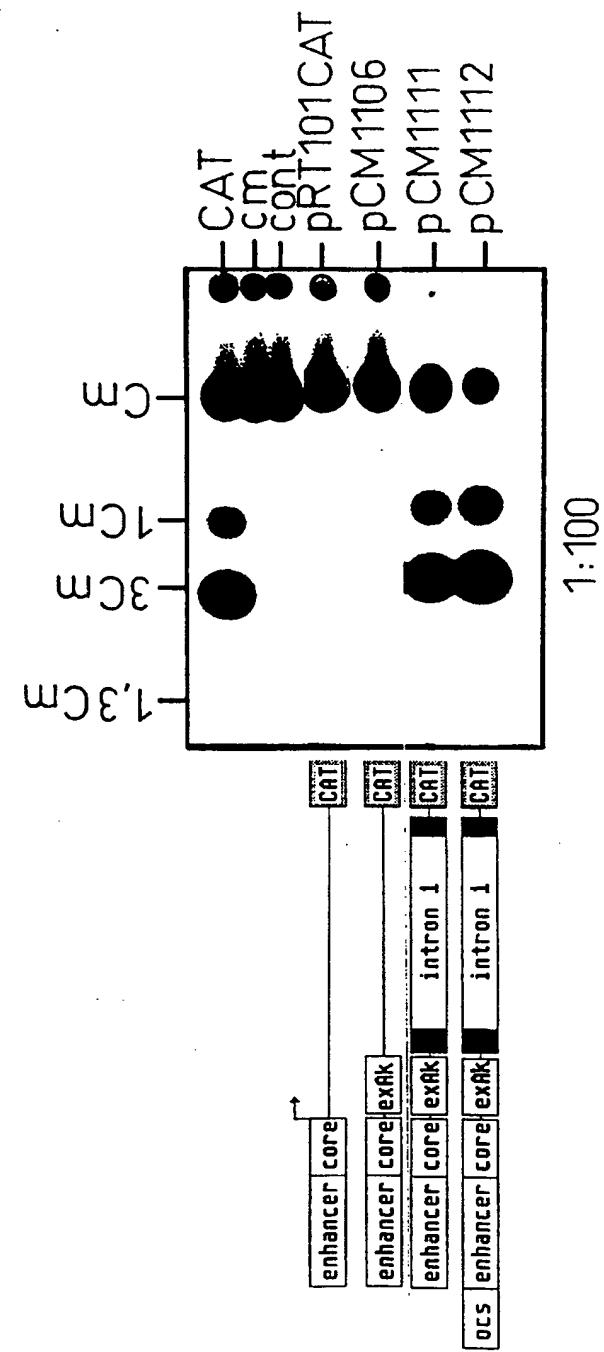
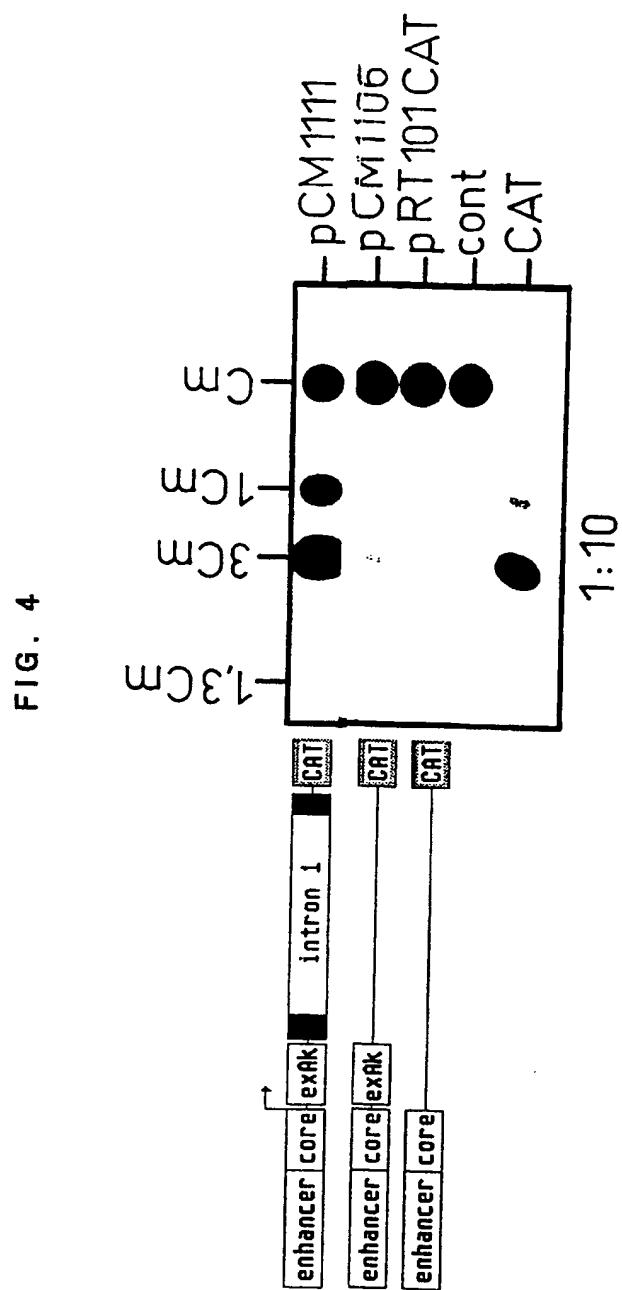


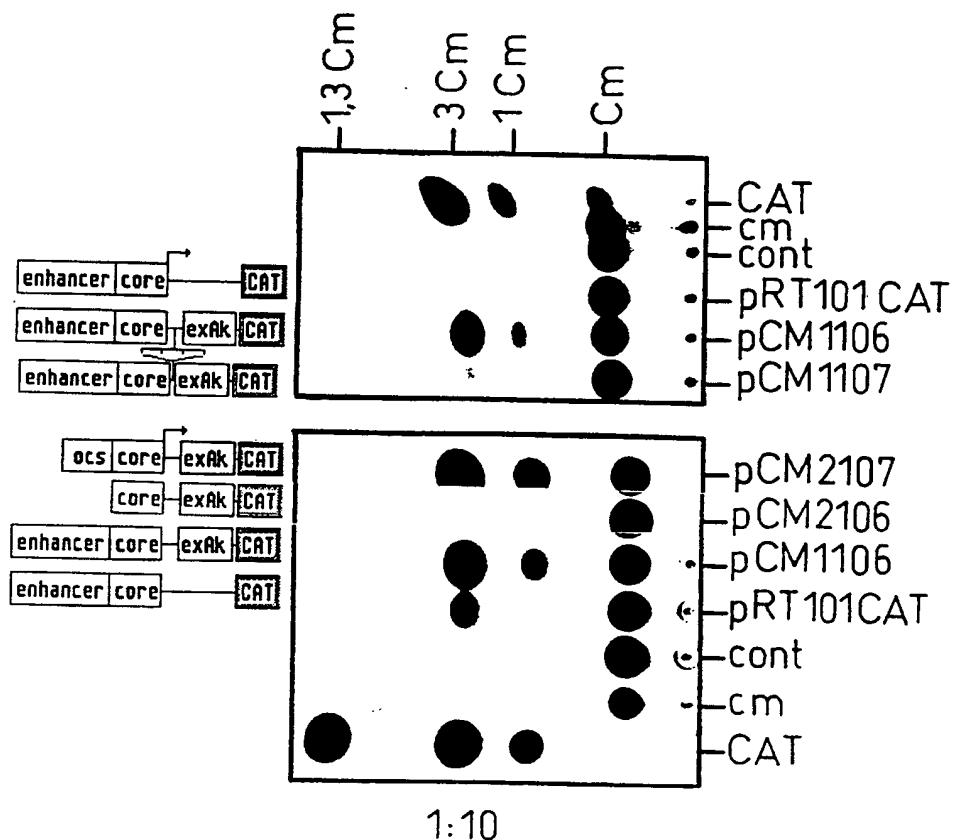
FIG. 3

5/5



5/5

FIG. 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/01769

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>5</sup> C12N15/82; C12N15/29; C12N5/10; A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>5</sup> C12N; A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY. Vol.16, 1991, DORDRECHT, THE NETHERLANDS. pages 199-207 MAAS, C., ET AL. "The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold" see the whole document ---	1-8
A	THE PLANT CELL. Vol.2, No.2, February 1990, ROCKVILLE, MD, USA. pages 163 - 171 MCELROY, D., ET AL. "Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation" cited in the application see the whole document ---	1-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 October 1993 (21.10.93)	29 October 1993 (29.10.93)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/01769

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOL.GEN.GENET. Vol.231, 1991, pages 150-160</p> <p>MCELROY, D., ET AL. "Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act 1) 5' region for use in monocot transformation" see the whole document</p> <p>-----</p>	1-8
A	<p>THE PLANT CELL Vol. 3, No. 11, November 1991, pages 1155-1165</p> <p>ZHANG, W., ET AL. "Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants" see the whole document</p> <p>-----</p>	7

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 93/01769

Internationales Aktenzeichen

## I. KLASSEKTIFFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)<sup>6</sup>

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12N15/82; C12N15/29; C12N5/10; A01H5/00

## II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff <sup>7</sup>

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int.Kl. 5	C12N ; A01H

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>

## III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN <sup>9</sup>

Art. <sup>o</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
A	<p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY.          Bd. 16, 1991, DORDRECHT, THE NETHERLANDS.          Seiten 199 - 207          MAAS, C., ET AL. 'The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold'          siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-8

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen <sup>10</sup> :

- <sup>"A"</sup> Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- <sup>"E"</sup> älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- <sup>"L"</sup> Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- <sup>"O"</sup> Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- <sup>"P"</sup> Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- <sup>"T"</sup> Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- <sup>"X"</sup> Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- <sup>"Y"</sup> Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- <sup>"A"</sup> Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

## IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. OKTOBER 1993

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29 -10- 1993

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevoilächtigten Bediensteten

MADDOX A.D.

## III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	THE PLANT CELL. Bd. 2, Nr. 2, Februar 1990, ROCKVILLE, MD, USA. Seiten 163 - 171 MCELROY, D., ET AL. 'Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-8
A	MOL.GEN.GENET. Bd. 231, 1991, Seiten 150 - 160 MCELROY, D., ET AL. 'Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act 1) 5' region for use in monocot transformation' siehe das ganze Dokument ---	1-8
A	THE PLANT CELL Bd. 3, Nr. 11, November 1991, Seiten 1155 - 1165 ZHANG, W., ET AL. 'Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants' siehe das ganze Dokument -----	7